

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

**0 325 970
A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 89100611.6

(51) Int. Cl. 4: **C07H 21/00**

(22) Anmeldetag: 14.01.89

(30) Priorität: 23.01.88 DE 3801987

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.08.89 Patentblatt 89/31

(54) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**
Sandhofer Strasse 116
D-6800 Mannheim 31(DE)

(72) Erfinder: Sellger, Heinz Hartmut, Prof. Dr.
Hasenweg 1
D-7915 Elchingen-Thalflingen(DE)
Erfinder: Groeger, Gabriele
Elchinger Strasse 6
D-7915 Elchingen 1(DE)

(54) Träger zur enzymatischen oder chemischen und enzymatischen Umsetzung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten an Festphasen.

(57) Die Erfindung betrifft Träger zur enzymatischen oder chemischen und enzymatischen Umsetzung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten an Festphasen bestehend aus einem unlöslichen, nicht quellbaren, porösen Polymeren, an das ein oder mehrere eventuell mit in der Nukleinsäurechemie üblichen Schutzgruppen versehene Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmente fixiert sind, wobei die Poren des Polymeren im wesentlichen eine definierte Größe zwischen 1400 und 10000 Å besitzen, sowie die Verwendung solcher Träger bei chemischen oder/und enzymatischen Umsetzungen von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten an fester Phase.

EP 0 325 970 A1

Träger zur enzymatischen oder chemischen und enzymatischen Umsetzung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten an Festphasen

Die Erfindung betrifft unlösliche, polymere Träger zur enzymatischen oder chemischen und enzymatischen Umsetzung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten an Festphasen.

Für die gezielte Synthese von Nukleinsäuren werden im allgemeinen Nukleinsäurefragmente, d. h. Bruchstücke ganzer Nukleinsäuren, Oligomere bzw. Monomere mittels einer Kombination chemischer und enzymatischer Reaktionen miteinander verknüpft. So können z. B. zum Aufbau von Deoxyribonukleinsäure (DNA) Oligodeoxyribonukleotidfragmente von ca. 15 - 60 Einheiten Kettenlänge chemisch synthetisiert und diese dann nach Phosphorylierung am 5'-Ende gemischt und in enzymkatalysierter Reaktion mittels DNA-Ligase zu doppelsträngiger Nukleinsäure zusammengefügt werden, wobei die richtige Positionierung der einzelnen Fragmente durch gegenseitige Watson-Crick-Basenpaarung aufgrund der Hybridisierung und somit zumindest teilweise Überlappung der Fragmente erreicht wird. Chemisch synthetisierte oder in enzymkatalysierter Reaktion gewonnene Oligoribonukleotide lassen sich entsprechend mit RNA-Ligase zu Ribonukleinsäuren (RNA) verknüpfen. Analog können auch Nukleinsäuren, die sowohl DNA- als auch RNA-Fragmente enthalten als Einzelstrang erhalten werden.

Im folgenden werden unter Nukleinsäuren alle möglichen Arten und Formen von Nukleinsäuren verstanden. Es können sowohl Deoxyribonukleinsäuren als auch Ribonukleinsäuren und auch gemischte Polynukleotide sein, die sowohl aus Monomeren von Deoxyribonukleinsäuren und aus Monomeren von Ribonukleinsäuren bestehen. Weiter können die Nukleinsäuren als Einzel- oder Doppelstrang vorliegen.

Teile oder Fragmente von Nukleinsäuren können sowohl Monomere, wie Nukleoside oder Nukleotide, sein als auch Oligomere aus 2 - 100 Monomereinheiten, und auch größere Polymere mit mehreren hundert Monomereinheiten sind möglich.

Für die enzymkatalysierte Verknüpfung von Nukleinsäurefragmenten hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn eines der Fragmente an einen polymeren unlöslichen Träger gebunden ist. So berichteten Cozzarelli et al. in Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 578 - 588 (1967) über die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mittels einer DNA-Ligase, wobei eines der Fragmente an Cellulose gebunden ist.

T. M. Jovin & A. Kornberg beschrieben in J. Biol. Chem. 243, 250 - 259 (1968) den Einsatz eines an Cellulose-Partikel gebundenen Oligomers von Deoxyribothymidin als Primer und Matrice für DNA-Polymerase.

U. Bertazzoni et al., Biochim. Biophys. Acta 240, 515 - 521 (1971) berichteten über die Kettenverlängerung von kovalent an Cellulose gebundenen Oligodeoxyribonukleotiden mittels terminaler Deoxyribonukleotidyl-Transferase.

A. Panet & H. G. Khorana, J. Biol. Chem. 249, 5213 - 5221 (1974) banden Polydeoxyribothymidin an Cellulose und verlängerten diese trägergebundene Nukleinsäure mittels Ligase um ein weiteres DNA-Fragment. Mit dem so dargestellten cellulosegebundenen Polynukleotid und einem kurzen Primer wurde mit DNA-Polymerase ein Teil des Polynukleotids repliziert.

Die Vorteile des Einsatzes immobilisierter Nukleinsäurefragmente für den enzymatischen Nukleinsäureaufbau sowie ganz allgemein für deren enzymatische Umsetzung werden vor allem in der leichten Abtrennung des immobilisierten Reaktionsprodukts von den übrigen für die Reaktion benötigten und während der Reaktion entstandenen Stoffe gesehen. Aufgrund dieser einfachen Möglichkeit zur Isolierung eines gewünschten Reaktionsprodukts kann auch durch Anwendung von Überschüssen an Enzym und/oder nicht immobilisiertem Substrat eine Verschiebung des Gleichgewichts zu höheren Ausbeuten an immobilisiertem Reaktionsprodukt, z. B. an kettenverlängertem Produkt, erreicht werden, ohne die anschließende Aufreinigung dadurch wesentlich zu erschweren.

Während Gele, wie quellbare unlösliche Polysaccharide, geeignete Träger für die enzymkatalysierte Umsetzung immobilisierter Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmente sind, hat es sich aber gezeigt, daß sich solche Materialien nur schlecht eignen, um Nukleinsäuren mit chemischen Methoden an polymeren unlöslichen Trägern aufzubauen oder zu verändern.

So müssen z. B. bei der chemischen Synthese von Nukleinsäuren, die üblicherweise von entsprechenden Monomeren, wie Nukleosiden oder Nukleotiden ausgeht, üblicherweise Zyklen durchlaufen werden, die im wesentlichen aus den Schritten: Aktivierung des zu verlängernden Nukleinsäureteils, eventuelle Isolierung des Produkts, Zugabe und Ankondensation eines neuen Nukleosids oder Nukleotids und Isolierung des Produkts bestehen.

Die teilweise oder vollständige Automatisierung solcher chemischer Verfahren zum Aufbau von Nukleinsäuren gelang nach Einführung der Festphasenmethoden, wobei die zu verlängernden Nukleinsäurefragmente an unlösliche Träger fixiert sind. Die Immobilisierung des "wachsenden" Nukleinsäureteils ermög-

licht so die jeweilige Reinigung des gewünschten Reaktionsproduktes durch einfaches Waschen der festen Phase. Lösliche Reaktionspartner werden mit der Festphase in Kontakt gebracht und nach Beendigung der Reaktion durch Waschen entfernt.

R. Frank et al., Nucl. Acids Res. 11, 4365 - 4377 (1983) beschrieben den Einsatz von Cellulose in Form von Papierblättchen ("disks") als feste Phase für die chemische Synthese von kurzen DNA-Fragmenten. Papier, Cellulose und generell alle Polysaccharide haben aber den grundsätzlichen Nachteil, daß alle nicht für die Fixierung der Nukleinsäure oder Nukleinsäurefragmente benötigten reaktiven Gruppen, wie Hydroxylreste, blockiert werden müssen, damit keine Störung der Syntheszyklen erfolgt. Eine vollständige Blockierung aller nicht als Nukleotidanker benötigten reaktiven Gruppen von als Trägermaterialien verwendeten Polysacchariden ist jedoch unmöglich, um so mehr als bei oftmaliger Wiederholung der Reaktionszyklen sich oft die makroskopische Struktur solcher festen quellfähigen Träger, z. B. durch Ausbildung von Rissen, ändert und so vorher unzugängliche reaktive Gruppen dann für Reaktanden zugänglich werden und zu Störungen des Reaktionsablaufs oder zu Nebenreaktionen führen können. Speziell bei Verwendung von Papier als Trägermaterial für die chemische Synthese von Nukleinsäuren kann so eine große Zahl von Fehlsequenzen auftreten. Die mangelnde mechanische Stabilität von Papier bei längerer Chemikalienbeanspruchung bringt außerdem Schwierigkeiten in der maschinellen Synthese mit sich, weswegen bisher Sequenzen von mehr als 20 - 25 Basen so nicht dargestellt werden.

Bei quellbaren Trägern können je nach Reaktionsmedium durch Quellung bzw. Entquellung des Materials beträchtliche Wasch- und Reaktionszeiten auftreten. Außerdem kann es zu Diffusionsproblemen kommen. Wegen dieser Nachteile werden üblicherweise nicht quellbare Träger für die chemische Umsetzung insbesondere die Synthese von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten eingesetzt. Ein gebräuchliches Material hierfür ist Silicagel.

Silicagel ist ein oft eingesetzter unlöslicher Träger für den chemischen Aufbau von Nukleinsäuren. Dieses Material besitzt eine breite Verteilung verschiedener Porengrößen und eine unregelmäßige Porenstruktur.

Für die Synthese doppelsträngiger DNA unter Verwendung sowohl chemischer als auch enzymatischer Reaktionsschritte wurden von Z. Hostomsky & J. Smrt in Nucleic Acids Research Symp. Ser. 18, 241-244 (1987) Fractosil 1000®, ein Silicagel mit einer Porengröße von 1000 Å und Sephacryl-500®, ein durch dreidimensionale Vernetzung von linearen Dextran-Ketten mit N,N'-Methylen-bis(acrylamid) erhältliches, hydrophiles, gelbildendes, d. h. quellbares Material auf ihre Eignung als Trägermaterialien miteinander verglichen. Es wurde dabei festgestellt, daß das nicht quellbare Silicagel im Gegensatz zu dem gelbildenden Träger die enzymatischen Reaktionen, Ligierung bzw. Freisetzung der fertigen Nukleinsäure vom Trägermaterial teilweise bzw. vollständig inhibiert.

Nach wie vor bestand deshalb bis heute Bedarf an Trägermaterial für den kombinierten Einsatz chemischer und enzymatischer Methoden zur Umsetzung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten an unlöslichem, polymerem Trägermaterial, das für chemische Reaktionen die Nachteile quellbarer Träger vermeidet und vorteilhaft für enzymatische Reaktionen eingesetzt werden kann.

Die Aufgabe der Erfindung war es, geeignete Träger für die enzymatische oder chemische und enzymatische Umsetzung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten an Festphasen bereitzustellen, die die vorstehenden Anforderungen erfüllen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die in den Ansprüchen charakterisierte Erfindung.

Der erfindungsgemäße Träger zur chemischen und enzymatischen Umsetzung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten besteht aus einem unlöslichen, nicht oder nicht wesentlich quellbaren, porösen Polymeren, an das die zur Reaktion zu bringenden Nukleinsäuren oder Teile von Nukleinsäuren eventuell mit in der Nukleinsäurechemie üblichen Schutzgruppen versehen, fixiert sind, wobei die Poren des Polymeren im wesentlichen eine definierte Größe innerhalb eines bestimmten Bereiches aufweisen. Die Poren müssen einerseits so groß sein, daß Enzyme im wesentlichen ungehinderten Zugang zu den zur Reaktion zu bringenden fixierten Nukleinsäuren oder Teilen von Nukleinsäuren haben. Andererseits müssen die Poren so klein sein, daß der Träger eine große Oberfläche aufweist, die viele Reaktionsstellen anbietet, um so mit möglichst wenig Trägermaterial möglichst viele Nukleinsäure-Moleküle umsetzen zu können. In diesem Sinne haben sich Träger als bevorzugt erwiesen, die Poren einer definierten Größe zwischen 1400 und 10000 Å besitzen. Bevorzugt sind solche Polymere, deren Poren im wesentlichen definierte Größen zwischen 2000 und 5000 Å, insbesondere zwischen mehr als 2500 und 5000 Å aufweisen, wobei unter "definiert" eine maximale Abweichung von $\pm 10\%$ vom angegebenen Wert verstanden wird.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß solche Polymere, die diese Porengrößenbedingungen erfüllen und die von ihrer Zusammensetzung her gegenüber den für die chemische und enzymatische Umsetzung von Nukleinsäuren erforderlichen Agenzien resistent sind, sich gut für sowohl chemische als auch enzymatische Reaktionen, wie z. B. solche für die Synthese von Nukleinsäuren eignen, die manuell

oder automatisch durchgeführt werden können. Insbesondere wenn es sich bei dem Trägerpolymeren um ein Material handelt, das wässrige Lösungen, insbesondere Pufferlösungen, als Medien für Enzymreaktionen nicht aus den Hohlräumen ausschließt, laufen enzymatische Reaktionen, wie Ligierungen mit Ligasen oder Abspaltungen von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten, z. B. mit Restriktionsenzymen, schnell und vollständig ab.

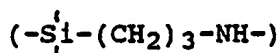
Als bevorzugte Trägerpolymere werden anorganische Materialien, insbesondere solche, die im wesentlichen aus Silicium- und Sauerstoffatomen aufgebaut sind, eingesetzt.

Ganz besonders geeignet hat sich für chemische und insbesondere auch für enzymatische Umsetzungen von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten Glas mit einer kontrollierten Porengröße von etwa 3000 Å erwiesen.

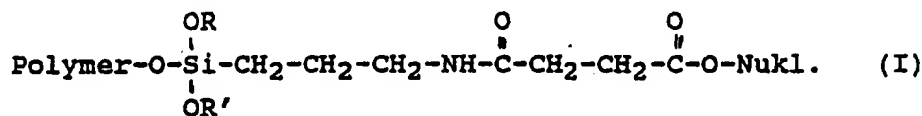
Die Art des polymeren Trägermaterials ist ausschlaggebend für die vorteilhafte Einsatzmöglichkeit des erfindungsgemäßen Trägers für den kombinierten Einsatz chemischer und enzymatischer Methoden zur Umsetzung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten. So ist es z. B. nicht nötig, nach Abschluß einer chemischen Synthese von Nukleinsäureketten diese von der hierfür verwendeten festen Phase abzutrennen und für die enzymatische Kettenverlängerung ein anderes Trägermaterial zu wählen. Verluste durch Abtrenn- und Ankopplungsreaktionen können mit dem erfindungsgemäßen Träger vermieden werden. Ganz besonders für enzymatische Umsetzungen ist der erfindungsgemäße Träger hervorragend geeignet.

Die immobilisierten Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmente können auf die unterschiedlichste Art und Weise an das Trägermaterial fixiert sein. Besonders vorteilhaft ist es jedoch, wenn der Träger zur Festphasensynthese von Nukleinsäuren die eventuell mit in der Nukleinsäurechemie üblichen Schutzgruppen versehenen Nukleinsäurefragmente kovalent an das unlösliche, nicht quellbare, poröse Polymere gebunden enthält. Für die chemische Synthese von Nukleinsäuren geht man dabei in bekannter Weise meist von eventuell geschützten Monomeren entsprechender Nukleinsäuren aus, es können aber auch Oligomere eingesetzt werden. Bei der enzymatischen Umsetzung sind oft größere Nukleinsäurefragmente an das polymere Trägermaterial gebunden. Die enzymatische Umsetzung von kleinen Nukleinsäurefragmenten ist aber natürlich oft genauso möglich.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Trägers sind die Nukleinsäurefragmente über einen Spacer an das Polymer gebunden. Als Spacer kommen eine Vielzahl von Substanzen in Betracht, die von dem Fachmann je nach den zur Frage stehenden Umsetzungen ausgewählt werden können. Gesichtspunkte für eine solche Wahl sind insbesondere die Stabilität gegenüber den jeweils gewählten Reaktionsbedingungen bei sowohl den chemischen als auch den enzymatischen Umsetzungen. Ganz besonders vorteilhaft hat es sich innerhalb der Methoden der chemischen Nukleinsäuresynthese für die heutzutage vorherrschende Phosphitmethode erwiesen, wenn die zur Reaktion zu bringende eventuell mit in der Nukleinsäurechemie üblichen Schutzgruppen versehene Nukleinsäure oder der Teil einer Nukleinsäure mit einem Aminopropylsilyl-Spacer



an das Trägermaterial gebunden ist. Speziell Träger der allgemeinen Formel I



in der

Polymer ein Glas mit einer kontrollierten Porengröße zwischen mehr als 2500 und 5000 Å, bevorzugt von etwa 3000 Å,

R und R', die gleich oder verschieden sein können, C₁-C₃-Alkyl oder Polymer, und Nukl. eine eventuell mit in der Nukleinsäurechemie üblichen Schutzgruppen versehene Fragment einer Nukleinsäure

bedeuten, haben sich für die kombinierte chemische und enzymatische Synthese von Nukleinsäuren hervorragend bewährt. Insbesondere enzymatische Umsetzungen können hieran vorteilhaft durchgeführt werden.

Das Fragment einer Nukleinsäure in der Bedeutung von Nukl. kann sowohl ein einzelnes Nukleotid als

auch ein Oligomer aus 2 - 100 Monomereinheiten oder ein größeres Polymer mit mehreren hundert Monomereinheiten sein.

Als Fragment einer Nukleinsäure in der Definition von Nukl. haben sich für enzymatische Umsetzungen besonders Oligonukleotide aus 6 - 30 Nukleotiden bewährt. Ganz besonders bevorzugt sind solche Oligonukleotide aus 15 - 25 Nukleotiden.

Analog dem von T. Atkinson und M. Smith bei M. J. Gait (Ed.) in "Oligonucleotide synthesis - a practical approach", IRL Press, Oxford, Washington D.C. (1984), S. 45 - 49 beschriebenen Verfahren kann ein solcher ganz besonders bevorzugter Träger durch Aminopropylierung von controlled pore glass 3000 Å (CPG 3000, Serva, Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland) und Umsetzung mit dem entsprechenden am 3'-Ende durch p-nitrophenylsuccinyl substituierten eventuell durch in der Nukleinsäurechemie üblichen Schutzgruppen versehenen Nukleinsäurefragment hergestellt werden. Es können so Beladungsdichten von etwa 1 µmol bis 30 µmol Nukleinsäure oder Nukleinsäurefragment pro Gramm polymerem Trägermaterial hergestellt werden. Besonders bevorzugt sind Träger mit einer Beladungsdichte von 5 bis 11 µmol/g.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Synthese von Nukleinsäure nach einer Festphasenmethode, wobei als feste Phase ein unlösliches, nicht quellbares, poröses Polymeres eingesetzt wird, dessen Poren im wesentlichen eine definierte Größe zwischen 1400 und 10 000 Å besitzen. Vorzugsweise haben die Poren eine kontrollierte Größe zwischen 2000 und 5000 Å, insbesondere zwischen mehr als 2500 und 5000 Å.

Unter Festphasenmethoden werden hier alle diejenigen Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren verstanden, die heterogen ablaufen, d. h. wo ein Nukleinsäureteil, sei es ein Monomer, wie ein eventuell mit in der Nukleinsäurechemie üblichen Schutzgruppen versehenes Nukleosid oder Nukleotid, oder ein aus mehreren Monomereinheiten bestehendes eventuell ebenfalls geschütztes Nukleinsäurefragment an ein unlösliches Trägermaterial fixiert wird, mittels chemischer und enzymatischer Reaktionen oder mittels enzymatischer Reaktionen alleine um eine oder mehrere Monomereinheiten verlängert und nach Abschluß der Synthese die fertige Nukleinsäure gegebenenfalls von der festen Phase abgelöst wird.

Für die chemische Synthese von Nukleinsäuren sind das Phosphodiester-, Phosphotriester- und das Phosphitverfahren üblich, wobei sich gerade die beiden letzten Methoden und hiervon insbesondere die Phosphitmethode für die Festphasensynthese von Nukleinsäuren als vorteilhaft erwiesen haben.

Während sich mit chemischen Verfahren am besten Oligonukleotide aus etwa bis zu 60 Monomereinheiten synthetisieren lassen, können diese mit enzymatischen Methoden zu Nukleinsäuren aus mehreren hundert Monomereinheiten verlängert werden, wie dies bereits in der Beschreibung des Standes der Technik wiedergegeben ist. Übliche Enzyme sind z. B. Kinasen, Polymerasen und Ligasen. Auch zur Abspaltung der an einer Festphase fertig synthetisierten Nukleinsäure von der Trägermatrix können Enzyme eingesetzt werden, z. B. Restriktionsendonukleasen.

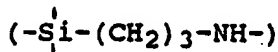
Bisher war eine effiziente, eventuell automatisierbare Synthese von Nukleinsäuren, die chemische und enzymatische Verfahrensschritte beinhaltet, nur möglich, wenn im Falle des Einsatzes quellbarer Festphasen die Nachteile mangelnder mechanischer Stabilität, langer Wasch- und Reaktionszeiten sowie eventueller Nebenreaktionen oder im Falle des Einsatzes nicht quellbarer Festphasen eventuelle Inhibierungen eingesetzter Enzyme und damit unvollständige Reaktionen in Kauf genommen wurden. Zur Vermeidung einiger dieser Nachteile konnten die chemischen Syntheseschritte auf einem nicht quellbaren Trägermaterial und die enzymatischen Syntheseschritte auf einem quellbaren Material durchgeführt werden. Dies bedeutete jedoch, daß während der Synthese das Trägermaterial gewechselt werden mußte und verlustreiche Abtrenn- und Ankopplungsreaktionen durchgeführt werden mußten.

Das erfindungsgemäße Verfahren mit den Schritten: Fixierung eventuell mit Schutzgruppen versehener Nukleinsäurefragmente an ein unlösliches, nicht quellbares, poröses Polymer, Verlängerung der immobilisierten Nukleinsäurefragmente durch weitere Nukleinsäurefragmente und gegebenenfalls Abspaltung fertiger Nukleinsäuren vom unlöslichen Polymer weist diese Nachteile nicht auf. Es ist in sehr vorteilhafter Weise für den kombinierten chemischen und enzymatischen Nukleinsäureaufbau geeignet. Ein Wechsel des Trägermaterials bei Kombination chemischer und enzymatischer Syntheseschritte ist nicht nötig. Ganz besonders ist das Verfahren für die enzymatische Nukleinsäuresynthese geeignet.

Erfindungsgemäß wird als Trägermaterial ein im wesentlichen aus Silicium- und Sauerstoffatomen bestehendes Polymer bevorzugt, das sich durch seine große mechanische Stabilität und durch seine hohe permanente Porosität und geringe Quellungsporosität besonders auszeichnet. Dies gilt ganz besonders für Glas einer definierten Porengröße zwischen 1400 und 10000 Å. Insbesondere Glas einer kontrollierten Porengröße von etwa 2000 - 5000 Å, vorzugsweise zwischen mehr als 2500 und 5000 Å und ganz besonders solches einer kontrollierten Porengröße von etwa 3000 Å zeigt hervorragende Eigenschaften, die es als nicht quellbares, poröses Material für eventuell automatisierbare Festphasenverfahren empfehlen. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Eignung zur Immobilisierung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäure-

fragmenten und die Eignung solcher festphasengebundener Substanzen als Enzymsubstrate zu wirken.

Nukleinsäurefragmente können auf die unterschiedlichste Art und Weise an das Trägermaterial fixiert werden. Besonders vorteilhaft ist es jedoch, wenn die Nukleinsäurefragmente, die gegebenenfalls mit Schutzgruppen versehen sein können, kovalent an das unlösliche, nicht quellbare Polymere gebunden werden, vorzugsweise über einen Spacer, wobei als Spacer eine Vielzahl von Substanzen in Betracht kommen, die von dem Fachmann je nach den zur Frage stehenden Umsetzungsbedingungen gewählt werden können. Ganz besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn die Nukleinsäurefragmente, die gegebenenfalls durch eine in der Nukleinsäurechemie übliche Schutzgruppe geschützt sein können, mit einem Aminopropylsilyl-Spacer



an das Trägermaterial gebunden werden, z. B. mittels $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$. Insoweit sind die vorstehend beschriebenen Träger der allgemeinen Formel I besonders geeignet für das erfindungsgemäße Verfahren.

Eine Inhibierung von Enzymen wird hierbei nicht beobachtet. Dies gilt insbesondere für Polynukleotidkinase, DNA-Polymerase sowie RNA- und DNA-Ligase und Restriktionsendonukleasen. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich deshalb ganz besonders für enzymkatalysierte Umsetzungen immobilisierter Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmente. Beispiele solcher enzymatischen Umsetzungen sind die enzymatische Phosphorylierung von Oligonukleotidfragmenten, wie z. B. Oligodeoxythymidylat mit T₄-Polynukleotid-Kinase,

das Anlagieren von DNA-Fragmenten an Oligonukleotide, wie z. B. Oligodeoxythymidylat mit Hilfe von DNA-Ligase in Gegenwart eines Gegenstrangfragments,

Kettenverlängerung durch einsträngiges Anknüpfen von DNA-Fragmenten mit 3'-Riboterminalus an ein immobilisiertes Oligonukleotid, wie z. B. Oligodeoxythymidylat, mit Hilfe von RNA-Ligase,

Replikation eines immobilisierten RNA-DNA-Hybridstranges durch Klenow-DNA-Polymerase in Gegenwart eines universell einsetzbaren Starteroligonukleotids, wie z. B. Oligodeoxyadenylat oder

Abschneiden eines immobilisierten Oligonukleotid-Doppelstranges durch den Einsatz von Restriktionsenzymen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines unlöslichen, nicht quellbaren, porösen Polymeren, dessen Poren im wesentlichen eine definierte Größe zwischen 1400 und 10000 Å haben, als Trägermaterial für die Immobilisierung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmente, insbesondere dann, wenn solche trägerfixierten Verbindungen zur enzymatischen oder chemischen und enzymatischen Umsetzung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten an einer Festphase eingesetzt werden. Solche Polymere eignen sich auch zum Einsatz für Syntheseautomaten zum Aufbau von Nukleinsäuren, da sie sich durch hohe mechanische Stabilität und dauerhafte Belastbarkeit mit wechselnden Reagenzien und Lösungsmitteln auszeichnen. Ganz besonders geeignet sind die vorgenannten Polymere jedoch als Trägermaterial für enzymatische Umsetzungen, da diese daran ungehindert ablaufen.

Bevorzugt sind anorganische Polymere, insbesondere solche, die im wesentlichen aus Silicium- und Sauerstoffatomen aufgebaut sind. Vorteilhafterweise besitzen solche Polymere Poren definierter Größe zwischen 2000 und 5000 Å, insbesondere zwischen mehr als 2500 und 5000 Å. Ganz besonders vorteilhaft hat sich Glas mit einer kontrollierten Porengröße von etwa 3000 Å erwiesen.

Solche weitporigen, nicht quellbaren Polymere eignen sich für die chemische Synthese, weil sie leicht auswaschbar sind, so daß Reagenzienüberschüsse und Lösungsmittel gut entfernt werden können. Außerdem erlaubt das erfindungsgemäße Trägermaterial sehr hohe, nahezu quantitative Ausbeute bei den chemischen Kondensationsschritten.

Als besonders vorteilhaft erweist sich die erfindungsgemäße Verwendung weitporigen, nicht quellbaren Polymers für enzymatische Reaktionen zum Aufbau oder zur Abkopplung von Nukleinsäuren vom Trägermaterial. Enzyme werden durch das Material nicht inhibiert und akzeptieren die damit immobilisierten Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmente als Substrate.

Im folgenden wird die Erfindung durch Beispiel 1 näher erläutert. Diese sollen jedoch keine Einschränkung des Erfindungsgegenstandes bedeuten.

In den Beispielen verwendete Abkürzungen:

Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

	DTT	Dithiothreitol
	ATP	Adenosin-5'-triphosphat
	EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
	Cpm	Counts pro Minute
5	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	PEG	Polyethylenglykol
	TE	Tris/EDTA-Puffer
	BSA	Rinderserum-Albumin
10	DMTrdT	mit Dimethoxytritylgruppe in 5'-Position substituiertes Deoxythymidin
	MSNT	-(Mesitylsulphonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol
	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
	TEA	Triethylamin

16

Beispiel 1

Synthese immobilisierter (dT)₂₀ Oligonukleotide

20

A) Synthese immobilisierten monomeren Deoxythymidins

25 a) Trägermaterial Controlled Pore Glass (CPG) (Serva, Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland)

Aminopropylierung

30 Die Aminopropylierung des Trägermaterials erfolgte analog der Literaturstelle Matteucci und Caruthers, J. Amer. Chem. Soc. 103, 3185 - 3191 (1981). Ansatz:

5 g CPG 1400 bzw. CPG 3000

2,6 ml 3-Aminopropyltriethoxysilan

3 ml Trimethylchlorsilan

35

CPG 1400 bzw. CPG 3000 wird durch Umsetzung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan in 50 ml Toluol funktionalisiert. Die Reaktionsmischung wird 12 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 18 h unter Rückfluß gekocht. Der Träger wird abgesaugt und dreimal mit je 20 ml Toluol, dreimal mit je 20 ml Methanol und zweimal mit je 20 ml 50 %iger wässriger Methanol-Lösung gewaschen. Das CPG wird dann über Nacht in wässriger Methanol-Lösung geschüttelt. Die flüssige Phase wird abgetrennt und das CPG zweimal mit je 20 ml Methanol gewaschen. Anschließend wird es zunächst an der Luft, anschließend im Vakuum getrocknet.

40

Nicht umgesetzte Hydroxylgruppen des Glases werden durch Reaktion mit Trimethylchlorsilan in 10 ml abs. Pyridin blockiert. Die Suspension wird über Nacht geschüttelt, anschließend abgesaugt und das Glas fünf mal mit je 20 ml Methanol und dreimal mit je 20 ml Diethylether gewaschen. Nach Lufttrocknung erfolgt die vollständige Trocknung des aminopropylierten CPG im Vakuum.

45

5'-O-DMTr-3'-O-Succinyl-nucleosid

50

Analog dem Verfahren von Matteucci und Caruthers, J. Amer. Chem. Soc. 103, 3185 - 3191 (1981) werden

2,5 mmol DMTrdT

2,0 mmol (200 mg) Bernsteinsäureanhydrid

55 300 mg 4-N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP)

5 ml Pyridin, abs.

umgesetzt. 5'-O-DMTr-geschütztes Deoxythymidin wird in Pyridin aufgelöst, zweimal absolutiert und mit DMAP sowie Bernsteinsäureanhydrid versetzt. Der Ansatz wird 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt

und dann dünnschichtchromatographisch geprüft. Bei ausreichendem Umsatzgrad wird das Pyridin entfernt und der Rückstand in 30 ml Dichlormethan aufgelöst. Die Dichlormethanolösung wird gegen eisgekühlte 10 %ige wässrige Zitronensäure ausgeschüttelt und die organische Phase anschließend zweimal mit je 15 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen der Dichlormethanschicht über Natriumsulfat wird die Lösung am Rotationsverdampfer konzentriert und in 250 ml Petrolether ausgefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und noch zweimal mit je 20 ml Petrolether nachgewaschen. Die Ausbeute beträgt 90 % der Theorie.

Darstellung des p-Nitrophenylesters

Analog dem Verfahren von Matteucci und Caruthers, J. Amer. Chem. Soc. 103, 3185 - 3191 (1981) werden
 1 mmol 3'-O-succinyliertes Nucleosid (wie vorstehend beschrieben hergestellt)
 1 mmol (207 mg) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)
 1 mmol (140 mg) 4-Nitrophenol
 3 ml Dioxan, abs.
 0,2 ml Pyridin, abs.
 umgesetzt. 5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-succinyl-deoxythymidin wird in der pyridinhaltigen Dioxanlösung gelöst und das DCC zugefügt. Aus der anfangs klaren Lösung fällt innerhalb kurzer Zeit Dicyclohexylharnstoff aus. Nach zwei Stunden Reaktionsdauer wird die Reaktionsmischung dünnschichtchromatographisch geprüft. Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und das Filtrat sofort mit dem vorbereiteten Trägermaterial umgesetzt.

Umsetzung der Aktivester mit dem aminopropylierten Träger

Analog Matteucci und Caruthers, J. Amer. Chem. Soc. 103, 3185 - 3191 (1981) werden
 1 mmol 5'-O-DMTr-3'-O-(4-nitrophenyl)succinyldeoxythymidin
 2,5 g Trägermaterial
 8 ml Dimethylformamid, wasserfrei
 1 ml Triethylamin, wasserfrei
 1 ml Acetanhydrid
 5 ml Pyridin, wasserfrei
 50 mg 4-N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP)
 umgesetzt. Aminopropyliertes CPG wird in Dimethylformamid suspendiert. Die Lösung des Nitrophenyl-Aktivesters des Monomeren wird zugesetzt, Triethylamin zugegeben und die Reaktionsmischung vorsichtig geschüttelt. Nach 12 Stunden Reaktionsdauer wird der Träger abgesaugt und mit Dimethylformamid, Methanol und Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen an der Luft wird die Substanz in Vakuum aufbewahrt.
 Die Maskierung unumgesetzter Aminogruppen erfolgt durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in absolutem Pyridin. Als Katalysator wird DMAP zugesetzt. Nach 30 Minuten wird der Träger abgesaugt, mit Methanol gewaschen, an der Luft und im Vakuum getrocknet.

b) Trägermaterialien Cellulose bzw. Sepharose

Beladung der organischen Trägermaterialien mit 3'-O-succinyliertem Nucleosid

Analog R. Frank et al., Nucl. Acids Res. 11, 4365 - 4377 (1983) werden
 2 g Trägermaterial (Whatman Filterplättchen, Nr. 3, Durchmesser 0,9 mm bzw. Sepharose 4B CL in Dioxan)
 1 mmol 3'-O-succinyliertes Deoxythymidin
 2,08 g (7 mmol) MSNT
 0,2 ml 1-Methylimidazol
 150 ml absolutes Pyridin
 50 ml Pyridin
 50 ml Chloroform

50 ml Ether
 20 ml Acetanhydrid
 1 g 4-N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP)
 zur Reaktion gebracht.

- 6 Das Trägermaterial wird dreimal mit jeweils etwa 20 ml absolutem Pyridin versetzt und absolutiert. Dann wird das 3'-O-succinylierte Nucleosid, MSNT und 1-Methylimidazol zugegeben und der Ansatz 3 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die sich während dieser Zeit schwarz verfärbende Reaktionslösung wird in einer Schlenk'schen Fritte weitgehend vom Träger abgesaugt und das Trägermaterial mit Pyridin, Chloroform und Ether wieder weiß gewaschen und getrocknet. Zur Blockierung noch unumgesetzter
 10 Hydroxylgruppen wird der Träger mit 40 ml einer Mischung aus 80 ml Pyridin, 20 ml Acetanhydrid und 1 g DMAP zwei Stunden lang geschüttelt. Danach wird das Material erneut mit Pyridin, Chloroform und Ether gewaschen und getrocknet.

15 c) Bestimmung der Trägerbeladung

Die Monomer-Beladung des Trägers wird durch die spektrophotometrische Quantifizierung der Farbe des Dimethoxytrityl(DMT_r)-kations bestimmt: Eine 1 mg Probe wird entnommen, das DMT_r-Kation durch Säurebehandlung freigesetzt und die Absorption bei 498 nm bestimmt. Die Desoxyribonucleosid-Beladung
 20 wird nach der Formel berechnet:

$$25 \quad \frac{E_{498}(\text{nm}) \times V (\text{ml}) \times 14,3}{\text{Einwaage (mg)}} = x \text{ umol Nucleotid/g Träger}$$

$$30 \quad 498 = 7 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$$

Es werden die folgenden Beladungen ermittelt:

Träger	Monomer	Beladung (umol/g)
CPG 1400	DMTrdT	15,8
CPG 3000	DMTrdT	10,4
Cellulose	DMTrdT	86,2
Sepharose	DMTrdT	91,3

45 B) Synthese von CPG-(dT₂₀), Cellulose-(dT₂₀) und Sepharose(dT₂₀)

a) Synthese von CPG-(dT₂₀)

- 50 Jeweils 20 - 50 mg mit dem unter A) hergestellten Deoxythymidin (3'-Terminus) beladenen CPG-Material werden in eine Stahlsäule oder Kartusche gefüllt, die durch ein Einspannsystem befestigt und mit einem SAM I-Synthesizer (Firma Biosearch) verbunden ist.

55

Reagenzien:	
Detritylierung:	3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan
Kondensation:	DMTrdTp ^{III} (NR ₂ ,Me) mit R = Isopropyl 350 mg Tetrazol in 10 ml absolutem Acetonitril wasserfreies Acetonitril
Oxidation:	500 mg Jod in 125 ml Tetrahydrofuran, 12,5 ml Wasser und 1 ml Pyridin
Capping:	12,5 ml Acetanhydrid in 12,5 ml TEA, 75 ml Acetonitril und 4 ml 1-Methylimidazol
Waschschritte:	wasserfreies Acetonitril

Die einzelnen Schritte eines Zyklus laufen wie folgt ab:

1. Detritylierung:

Die 3 %ige Trichloressigsäure in Dichlormethan wird zur Abspaltung der Dimethoxytrityl-Gruppe 2 - 3 Minuten lang durch das Trägermaterial gepumpt. Die rotgefärbten Detritylierungslösungen werden in einem Probensammler aufgefangen und können zur Ausbeutebestimmung herangezogen werden.

2. Waschen:

Säurespuren werden durch Waschen mit Acetonitril entfernt.

3. Kondensation: Von dem aktivierbaren Nucleosid (DMTrdTp^{III}(NR₂,Me) mit R = isopropyl) wird pro Kondensationszyklus 50 mg in einer Konzentration von 50 mg/ml in einem Vorratsgefäß vorgelegt, aus dem während den Kondensationszyklen vermischt mit der Tetrazol-Lösung das Monomere innerhalb einer Minute durch die Säule gepumpt wird. Anschließend wird das reaktionsfähige Monomere zur Verbesserung der Ausbeute 8 Minuten lang über eine Schleife durch die Säule umgepumpt.

4. Waschen:

Überschüssig eingesetzte Reaktanden werden durch mehrere Minuten dauerndes Waschen mit Acetonitril ausgespült.

5. Oxidation:

Durch zweiminütiges Durchpumpen der Jodlösung durch die Säule wird der dreiwertige Phosphor des Phosphorigsäuretriesters zum fünfwertigen Phosphor oxidiert.

6. Waschen:

Das Auswaschen der Oxidationslösung erfolgt wiederum durch Waschen mit Acetonitril.

7. Capping (Maskierung unumgesetzter Hydroxylgruppen):

Die Capping-Lösung wird zwei Minuten lang durch das Trägermaterial gepumpt.

8. Waschen:

Die Capping-Lösung wird durch Waschen mit Acetonitril aus dem Reaktionsgemisch entfernt.

Der Ablauf eines Synthesesyklus im SAM-Synthesizer erfordert einen Zeitaufwand von etwa 25 Minuten.

b) Synthese von Cellulose-(dT₂₀) und Sepharose-(dT)₂₀

Bei den Cellulose- und Sepharose-Materialien wurden die unter a) genannten Waschschritte auf etwa die doppelte Zeit verlängert (von üblicherweise zwischen 2 und 3 Minuten auf ca. 5 Minuten) Nach der Detritylierung war die Einführung eines zusätzlichen Waschschrittes mit Dichlormethan vor dem Waschen mit Acetonitril erforderlich, um alle noch im Trägermaterial befindlichen Säurespuren vollständig entfernen zu können. (2 Minuten Waschen mit Dichlormethan)

c) Beladungsdichte

Die Herstellung von (dT₂₀)-Oligonukleotiden an den verschiedenen Trägermaterialien im SAM I-Synthesegerät ergab folgende Beladungen:

Träger	Endbeladung
CPG 1400	11,7 umol/g
CPG 3000	7,8 umol/g
Cellulose-F.P.	25,4 umol/g
Sepharose CL	30,7 umol/g

5

- 10 Nach Abspaltung der Schutzgruppen (DMTr und Methoxy) verblieb das Oligonucleotid an der festen Phase und wurde nach Entfernung von Reagenzien und organischen Lösungsmitteln bis zur Verwendung für enzymatische Umsetzungen getrocknet und im Kühlschrank aufbewahrt.

15 d) Schutzgruppenabspaltung

Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe:

- 20 Während einer Synthese wird die DMTr-Gruppe mit 2 % Trichloressigsäure in Methylenchlorid während 2 min. bzw. 3 % Dichloressigsäure in Methylenchlorid innerhalb 3 min abgespalten. Soll das Produkt ohne Affinitätschromatographie aufgereinigt werden, so erfolgt die sofortige Detritylierung des Oligonucleotids noch im Syntheseapparat. Nach einer affinitätschromatographischen Aufreinigung erfolgt die Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe vom Oligonucleotid durch eine 30minütige Behandlung mit 80 %iger Essigsäure. Nach
25 erfolgter Lyophilisation wird zweimal Wasser zugegeben und erneut lyophilisiert. Die DMTr-Gruppe wird dann mit Ether extrahiert und das Produkt eingedampft.

Abspaltung der Methoxy-Gruppe am Phosphat

30

Die Abspaltung der Methoxygruppe erfolgt durch Behandlung des Trägers mit einer frisch bereiteten Lösung aus Thiophenol : TEA : Dioxan = 1 : 2 : 2 über einen Zeitraum von 45 min. Die flüssige Phase wird anschließend abgetrennt und der Träger dreimal mit 1 ml Methanol und dreimal mit 1 ml Diethylether gewaschen.

35

Beispiel 2

40 Enzymatische 5'-Phosphorylierung eines immobilisierten (dT)₂₀ Oligonucleotids

- Zu 100 µg CPG3000-(dT)₂₀ aus Beispiel 1 (ca. 500 pmol - 1 nmol 5'-OH-Enden) wird 1 µl Kinase-Puffer (400 mM Tris-Salzsäurepuffer pH 7,6, 100 mM Magnesiumchlorid, 10 mM DTT, 50 % Glycerin) 1 µl ³²p-ATP sowie 1 µl einer 100 µM kalten ATP-Lösung, 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase zugefügt und mit bi
45 destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Reaktionsmischung wird 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur quantitativen Phosphorylierung der freien 5'-Hydroxylgruppen wird anschließend 1 µl 1 mM ATP zugegeben und weitere 15 Minuten bei 37 °C reagieren gelassen. Die Beendigung der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 1 µl 250 mM EDTA-Lösung/10 µl Reaktionslösung

50

55

Reaktionsansatz:		
Stammliösung	Reagenz	Endkonzentration
400 mM	CPG 3000 ^{32}P -ATP	0,1 μM
100 mM	Tris.HCl pH 7,6	40 mM
10 mM	Magnesiumchlorid	10 mM
50 %	DTT	1 mM
4 μl	Glycerin	5 %
	T4-PN-Kinase	400 μml
10 μl	Gesamtvolumen	

Der Träger wird anschließend zur Entfernung ungebundener Reaktanden und Puffer fünfmal mit jeweils 500 μl 0,1 M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung gewaschen. Die Effizienz der Waschungen wird durch Cerenkov-Messung überprüft. Die am Träger verbleibende Restaktivitätsmenge liegt bei diesem Verfahren zwischen 8×10^5 und $2,4 \times 10^6$ cpm.

^{32}P zerfällt mit einer Halbwertszeit von 14 Tagen. Durch die Cerenkov-Messung werden die Zerfälle pro Minute (counts per minute, cpm) ermittelt. Dies erfolgt in einem formalen Szintillationszähler. Die Radioaktivitätsmenge zwischen 8×10^5 und $2,4 \times 10^6$ cpm läßt einen Schluß auf die Menge des eingebauten radioaktiven Phosphats im am Trägermaterial immobilisierten Oligonucleotid zu. Da anschließend durch Zugabe von "kaltem" ATP vollständig phosphoryliert wird, macht die Radioaktivitätsmenge eine Aussage darüber, ob die Kinase-Reaktion überhaupt stattgefunden hat, oder sei es durch irgendwelche Kontaminationen im Träger oder durch Salze bzw.

Unreinheiten des Oligonucleotids inhibiert war. Höhere Radioaktivitätsmengen sind günstig, da das Oligonucleotid über einen längeren Zeitraum sichtbar gemacht werden kann. Die Kinasierung des Träger-Oligonucleotids ist Voraussetzung für alle übrigen enzymkatalysierten Umsetzungen.

Beim Einsatz größerer Trägermengen (500 μg - 1 mg) wird in einem Gesamtvolumen von 40 μl gearbeitet, die anfängliche ATP-Konzentration liegt bei 100 μM , nach 15 Minuten wird 1 μl einer 10 mM ATP-Lösung zugesetzt. Reaktionstemperatur und -dauer bleiben gleich.

Beispiel 3

Enzymatische Verknüpfung von immobilisierten DNA-Fragmenten mit DNA-Ligase

Das kovalent an CPG 3000 gebundenes, 5'-terminal phosphorylierte Oligothymidylat aus Beispiel 2 wird zunächst in 15 μl Wasser mit Oligoadenylat und einem weiteren nicht immobilisierten Oligonucleotid, welches als 3'-Ende ein Oligothymidylat besitzt, durch dreiminütiges Aufheizen auf 100 °C und anschließendes, langsames Abkühlen auf Raumtemperatur hybridisiert. 2 μl DNA-Ligase-Puffer (760 mM Tris-Salzsäure-Puffer, pH 7,6, 10 mM Magnesiumchlorid, 1 mM ATP), 1 μl 1 mM ATP und 2 μl DNA-Ligase werden zugegeben und das Reaktionsgemisch 6 - 24 Stunden bei 20 °C inkubiert.

Reaktionsansatz:		
Stammliösung	Reagenz	Endkonzentration
1,5 mM	CPG 3000-(dT) ₂₀ P	150 μM
10 mM	Oligo A	1 mM
760 mM	Oligo T	76 mM
6 μl	ATP	600 μml
	Magnesiumchlorid	
	Tris.HCl, pH 7,6	
	DNA-Ligase	
20 μl	Gesamtvolumen	

Zur Bestimmung der Ausbeuten wird eine Probe entnommen (2 μl Suspension) durch 30minütige

Ammoniak-Behandlung vom Träger abgespalten und lyophilisiert. Anschließend Gelelektrophorese an einem 10 - 20 %, denaturierenden Polyacrylamidgel, 0,4 mm, sowie Ausschneiden der Edukt- und Produktbanden nach der Anfertigung des Autoradiogramms und Gelelution mit 0,5 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA wird durch Cerenkov-Vergleichsmessung der Umsatzgrad ermittelt.

Tabelle

DNA-Ligase-Reaktionen:			
CPG 3000-(dT) ₂₀ -Phosphat	Oligo A	Oligo T	Ausbeute an Ligierungsprodukt
1 mg	(dA) ₂₀ 1 nmol	(dT) ₁₀ 1,1 nmol	47 %
1 mg	(dA) ₁₂₋₁₈ 0,8 nmol	(dT) ₁₀ 1,1 nmol	47 %
500 ug	p(dA) ₂₅₋₃₀ 2,3 nmol	(dT) ₁₀ 5,5 nmol	69 %
100 ug	(dA) ₂₀ 1 nmol	(dCTAGGT ₁₀) 1 nmol	95 %

Beispiel 4

Enzymatische Verknüpfung von immobilisierten DNA-Fragmenten und Desoxyoligonucleotiden mit ribo-Terminus mit RNA-Ligase

Alle Puffer und Lösungen, die eingesetzt werden, werden zunächst autoklaviert oder steril filtriert.

Zu 100 µg immobilisiertem 5'-terminal phosphorylierten Eicosathymidylat aus Beispiel 2 wird Desoxyoligonucleotid mit 3'-Ribo-Terminus gegeben und lyophilisiert. Anschließend werden 15 µl 100 mM ATP-Lösung, 4 µl 10 mM Spermin, 4 µl 100 mM Magnesiumchloridlösung und 4 µl 100 mM DTT-Lösung dazugegeben und lyophilisiert. 2 µl 500 mM HEPES und 3 µl DM50 werden zugefügt, kurz geschüttelt und dann mit 10 µl 40 %iger Polyethylenglykol-Lösung sowie mit 5 µl RNA-Ligase aufgefüllt. Die Reaktionsmischung wird 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Reaktionsansatz:		
Stammlösung	Reagenz	Endkonzentration
100 uM	Träger-(dT) ₂₀ p Oligonucleotid-rA	75 mM
10 mM	ATP	2 mM
100 mM	Spermin	20 mM
100 mM	Magnesiumchlorid	20 mM
100 mM	DTT	20 mM
500 mM	HEPES-Puffer, pH 7,5	50 mM
100 %	DMSO	15 %
40 %	Polyethylenglykol (MW 6000)	20 %
11 mg/ml	RNA-Ligase	28 ug/ul
20 ul	Gesamtvolumen	

Durchgeführte Umsetzungen:			
Ansatz	gelöstes Oligonucleotid	Menge	Ausbeute
1	d(T ₇ A ₂)rA	1 nmol	55 %
2	d(T ₇ A ₂)rA	2 nmol	70 %
3	d(T ₇ A ₂)rA	4 nmol	63 %
4	d(T ₇ A ₂)rA	4 nmol	66 %
5	d(T ₇ A ₂)rA	5 nmol	82 %
6	d(GATCCA)rA	5 nmol	80 %
7	d(GATCCA)A	2 nmol	66 %
8	d(N) ₄₈ rA	500 pmol	30 %
9	d(N) ₄₈ rA	500 pmol	40 %
10	d(N) ₄₈ rA	700 pmol	46 %

Nach erfolgter Umsetzung wird der Träger dreimal mit jeweils 500 µl TE (10 mM Tris-Salzsäure-Puffer, pH 7,6, 2,5 mM EDTA) gewaschen, eine Probe entnommen, mittels Ammoniakbehandlung vom Träger abgespalten und gelelektrophoretisch an einem 10 - 20 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Analog zum Verfahren bei den DNA-Ligasereaktionen aus Beispiel 3 werden die Ausbeuten nach der Gelelektrophorese durch Cerenkov-Vergleichsmessungen bestimmt.

Wenn nach der ersten RNA-Ligasereaktion weitere RNA-Ligase-Reaktionen durchgeführt werden sollen, muß zunächst eine quantitative Phosphorylierung der DNA-Termini mit Hydroxylenden erfolgen. Hierfür muß der Träger zur Entfernung von Reagenzien aus der RNA-Ligasereaktion phenolisiert werden:

- Zugabe von 500 µl Phenol, 30 Sekunden mixen, 1 Minute zentrifugieren, Phenolphase abnehmen;
- Zugabe von 500 µl Phenol: Chloroform = 1:1, 30 Sekunden mixen, 1 Minute zentrifugieren, organische Phase abnehmen;
- Zugabe von 500 µl Isoamylalkohol: Chloroform = 1:25, 30 Sekunden mixen, 1 Minute zentrifugieren, organische Phase abnehmen, kurz evaporieren.

Durch eine anschließende erneute Durchführung der Phosphorylierungsreaktion mit T₄-Polynucleotid-Kinase liegt die Radioaktivität des Trägers wieder auf 1 - 2 x 10⁵ cpm und die 5'-Termini sind phosphoryliert. Eine weitere, im Anschluß durchgeführte Einzelstrangverknüpfung mit RNA-Ligase gibt am Beispiel der Trägerprobe 10, welche als immobilisierte Oligomere die Oligonucleotide (dT)₂₀p und dT₂₀-(dN)₄₈p enthält, folgende Umsetzungen:

Träger	gelöstes Oligonucleotid	Produkt Ausbeute	Nebenprodukt Ausbeute
CPG-T ₂₀ rAd(N) ₄₈ p	d(N) ₃₂ rA	CPG-dT ₂₀ rAd(N) ₄₈ rAd(N) ₃₂ 19 %	CPG-dT ₂₀ rAd(N) ₃₂ 11 %

Abkürzungen:

d(N)₄₈rA = 5' CGC CAT CAT CAA GAA CGC CTA CAA GAA GGG CGA
GTG ATA ACT GCA GCA rA

d(N)₃₂rA = 5' GAG CCA GAC GCC CCT GGT GAC GCT GTT CAA AA rA

Beispiel 5

Replikation eines immobilisierten Oligonucleotids mit Hilfe von DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)

Das universell einsetzbare Starteroligonucleotid (dA)₁₀₋₁₈ wird in 16 µl bidestilliertem Wasser und 3 µl Nicktranslation-Puffer (500 mM Tris-Salzsäure-Puffer, pH 7,2, 100 mM Magnesiumsulfat, 1 mM DTT, 500 µg/ml BSA) mit dem immobilisierten Eicosathymidylat aus Beispiel 1 hybridisiert. Dazu heizt man 3 Minuten auf 100 °C auf und läßt dann vorsichtig auf Raumtemperatur abkühlen. Nach Zugabe von 5 µl 10 mM Desoxynucleosidtriphosphat (enthält jeweils 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP) und 3 µl ³²P-dATP sowie 3 µl des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase wird die Replikation des am Träger immobilisierten Oligonucleotids eingeleitet.

Reaktionsansatz:		
Stammlösung	Reagenz	Endkonzentration
2 µM	Träger-(dT) ₂₀ -Oligo.	0,2 µM
10 mM	Oligo A - ³² P-ATP	1,6 µM
500 mM	dNTP	50 mM
100 mM	Tris.HCl pH 7,2	10 mM
1 mM	Magnesiumsulfat	0,1 mM
500 µg/ml	DTT	50 µg/ml
	BSA	
30 µl	Gesamtvolumen	

Durchgeführte Umsetzungen:

a) 200 pmol (dA)₁₆ werden in Gegenwart von 2 µl Klenow-Polymerase nach Hybridisierung an CPG3000-dT₂₀-rA(dA₂T₇) aus Beispiel 4 verlängert. Bestimmung des Erfolgs der Umsetzung durch Cerenkov-Vergleichsmessung nach fünfmaligem Waschen mit jeweils 500 µl TE (10 mM Tris-HCl, 0,25 mM EDTA, pH 8,0):

cpm Träger vor der Replikation:	41 400
cpm Träger nach der Replikation:	243 850
cpm Träger nach Denaturierung:	52 570
cpm Überstand nach Denaturierung:	184 330

b) Ca. 1 nmol des Oligoadenosin-Produkts aus dem Überstand nach Denaturierung aus Beispiel 5 a) (0,25 O.D.) als Oligonucleotidprimer und 15 µl Klenow-Polymerase werden analog Beispiel 5 a) eingesetzt.

Ermittlung des Erfolgs der Replikation durch Gelelektrophorese. Es werden zwei Proben A und B aufgetragen.

Bahn A): Banden nach Ammoniak-Behandlung einer Trägerprobe

Ergebnis: homologe Reihe ab ca. 14 mer bis 30 mer und 30 mer zeigen stärkere Bande

Bahn B) : Banden nach Trägerdenaturierung (nur Überstand) Ergebnis: homologe Reihe ab ca. 14 mer bis 30 mer

Beispiel 6

Einsatz von Restriktionsenzymen zum Abschneiden eines Oligonucleotid-Doppelstranges vom Träger

Eingesetzt wird CPG3000-dT₂₀-rA(dA₂T₇) nach erfolgter Klenow-Reaktion aus Beispiel 5. Der Ansatz wird in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Eine ca. 25 µg Trägerprobe (ein

Viertel des Ansatzes aus der DNA-Polymerase-Reaktion) aus Beispiel 5 wird mit 16 µl Wasser versetzt, 2 µl Low-salt-restriktionsendonuclease-Puffer (10 mM Tris-Salzsäure-Puffer, pH 7,5, 10 mM Magnesiumchlorid, 1 mM DTT) und 2 µl EcoRI zugegeben. Der Ansatz wird 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

5	Reaktionsansatz:		
	Stammlösung	Reagenz	Endkonzentration
10		CPG 3000-(dT) ₂₀ -Oligo.	
	10 mM	Tris. Cl pH 7,5	1 mM
	10 mM	MgCl ₂	1 mM
	1 mM	DTT	0,1 mM
15	20 µl	Gesamtvolumen	

Das Ergebnis der Spaltung wird nach Abspaltung der Proben vom Träger und deren Kinasierung durch Gelelektrophorese geprüft, wobei die Probe zunächst geteilt wird. Teil 1 wird hitzedenaturiert, Teil 2 wird sofort durch Ammoniakbehandlung abgespalten (enthält die immobilisierten sowie die durch Hybridisierung gebundenen Sequenzen). Die abgespaltenen Oligonucleotide werden über eine Sephadex G 50-Säule (Pasteur-pipette) mit bidestilliertem H₂O, pH 8, als Elutionsmittel entsalzt. Die im Totvolumen eluierten Proben werden lyophilisiert und nach der für Oligonucleotide in Lösung angegebenen Methode phosphoryliert. Zur Überprüfung des Ergebnisses der Spaltung wird ein Polyacrylamidgel eingesetzt.

Man erhält Produkte, die alle kürzer als das eingesetzte 30 mer sind. Es wird keine Inhibierung des Restriktionsenzym beobachtet.

Beispiel 7

Anligieren eines DNA-Fragmentes mit Hilfe von DNA-Ligase an ein an einen quellfähigen Träger gebundenes Oligonucleotid

35	Reaktionsansätze:				
	Träger/Menge	Oligo A	dT ₁₀	Ausbeute Ligierungsprodukt ges.	(dT) ₃₀
	CPG 3000 500 µg	p(dA) ₂₅₋₃₀ 2,3 nmol	5,5 nmol	69 %	51 %
40	Cellulose Fp 1 mg	p(dA) ₂₅₋₃₀ 2,3 nmol	5,5 nmol	68 %	43 %
	Sepharose CL4B 1 mg	p(dA) ₂₅₋₃₀ 2,3 nmol	5,5 nmol	65 %	41 %

Die angegebenen Ausbeuten sind bezogen auf den Umsatz des radioaktiv markierten Oligonucleotids am Träger.

Alle drei verwendeten Trägermaterialien waren bei der Kinasierung mit T4-PN-Kinase und der DNA-Ligasereaktion vergleichbar. Die beiden quellfähigen Träger waren jedoch sehr viel schwieriger von eingesetzten Reaktanden (deutlich sichtbar beim Auswaschen des eingesetzten radioaktiv markierten ATP) zu befreien. Selbst nach ausführlichen Waschschritten waren bei der Gelelektrophorese noch Anteile nicht kovalent gebundenen radioaktiven Phosphats vorhanden.

Bei der DNA-Ligasereaktion waren die Ausbeuten bei allen drei Trägern vergleichbar. Aufgrund der besseren chemischen Synthese an CPG 3000 ist jedoch die Ausbeute am gewünschten Ligationsprodukt (dT)₃₀ bei CPG 3000 eindeutig besser.

Cellulose Filterplättchen weisen bei der chemischen Synthese das Problem auf, daß durch Entstehen neuer Hydroxylgruppen durch die mechanische Beanspruchung des Trägermaterials Sequenzen kürzerer Kettenlänge gebildet werden. Dies ist beobachtbar durch Zunahme der Tritylfarbe.

Am problematischsten ist eine chemische Synthese bei Sepharose CL. Da der Träger äußerst quellfähig ist, müssen Waschschriffe zwischen den Reaktionsschritten über einen bedeutend längeren

Zeitraum durchgeführt werden. Die Automatisierung der Synthese ist nur sehr schwierig durchführbar. Außerdem ist wie bei Cellulose eine Zunahme der Tritylfarbe beobachtbar, so daß auch hier eine homologe Produktreihe, wenngleich mit deutlich stärker auftretendem Endprodukt entsteht.

5

Ansprüche

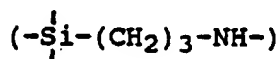
1. Träger zur enzymatischen oder chemischen und enzymatischen Umsetzung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten an einer festen Phase bestehend aus einem unlöslichen, nicht quellbaren, porösen Polymeren an das ein oder mehrere eventuell mit in der Nukleinsäurechemie üblichen Schutzgruppen versehene Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmente fixiert sind, dadurch gekennzeichnet, daß die Poren des Polymeren im wesentlichen eine definierte Größe zwischen 1400 und 10000 Å besitzen.

2. Träger gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer im wesentlichen aus Silicium- und Sauerstoffatomen aufgebaut ist.

3. Träger gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer ein Glas mit einer definierten Porengröße zwischen mehr als 2500 und 5000 Å ist.

4. Träger gemäß einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß eventuell mit Schutzgruppen versehene Nukleinsäurefragmente kovalent an das Polymere fixiert sind.

5. Träger gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß eventuell mit Schutzgruppen versehene Nukleinsäurefragmente über Aminopropylsilyl-Spacer



25

an das Polymer fixiert sind.

6. Verfahren zur enzymatischen oder chemischen und enzymatischen Festphasensynthese von Nukleinsäuren, wobei eventuell mit Schutzgruppen versehene Nukleinsäurefragmente an ein unlösliches, nicht quellbares, poröses Polymer fixiert, die immobilisierten Nukleinsäurefragmente durch weitere Nukleinsäurefragmente vergrößert und fertige Nukleinsäuren abschließend gegebenenfalls vom unlöslichen Polymer abgelöst werden, dadurch gekennzeichnet, daß als Polymer ein solches eingesetzt wird, dessen Poren im wesentlichen eine definierte Größe zwischen 1400 und 10000 Å besitzen.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer Glas einer definierten Porengröße zwischen mehr als 2500 und 5000 Å ist.

8. Verwendung eines unlöslichen, nicht quellbaren, porösen Polymeren, dessen Poren im wesentlichen eine definierte Größe zwischen 1400 und 10000 Å besitzen, als Trägermaterial für die enzymatische oder chemische und enzymatische Umsetzung von Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefragmenten an fester Phase.

9. Verwendung eines im wesentlichen aus Silicium- und Sauerstoffatomen aufgebauten, unlöslichen, nicht quellbaren, porösen Polymeren, dessen Poren im wesentlichen eine definierte Größe zwischen mehr als 2500 und 5000 Å besitzen, gemäß Anspruch 8.

10. Verwendung von Glas einer kontrollierten Porengröße von etwa 3000 Å gemäß Anspruch 8.

45

50

55



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 10 0611

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X	EP-A-0 090 789 (MONSANTO CO.) * Seite 3, Zeilen 1-11; Seite 7, Zeile 25 - Seite 8, Zeile 16; Ansprüche 1,7,11,16 *	1-9	C 07 H 21/00
X	EP-A-0 035 719 (UNIVERSITY PATENTS INC.) * Seite 3, Zeilen 16-18; Seite 7, Zeile 8 - Seite 10, Zeile 11; Seite 20, Zeilen 1-18; Ansprüche 1,3,4,6-9,12-15,17,18,21,25,34 *	1,2,4-6,8	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 107, 1987, Seite 192, Zusammenfassung Nr. 148577s, Columbus, Ohio, US; Y. HOSTOMSKY et al.: "Solid-phase assembly of DNA duplexes from synthetic oligonucleotides", & NUCLEIC ACIDS SYMP. SER. 1987, 18(SYMP. CHEM. NUCLEIC ACID COMPON., 7TH, 1987), 241-4	1,2,4-6,8	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
			C 07 H
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 03-03-1989	Prüfer GROENENDIJK M.S.M.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung alleine betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			